



①9 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 58 490 A 1**

⑤1 Int. Cl. 7:
G 01 N 21/00
G 01 N 21/64
C 12 Q 1/02
C 12 M 1/34
// G 01 N 21/65

②1 Aktenzeichen: 198 58 490.3
②2 Anmeldetag: 18. 12. 1998
④3 Offenlegungstag: 21. 6. 2000

DE 198 58 490 A 1

⑦1 Anmelder:
Laser- und Medizin-Technologie gGmbH, Berlin,
12207 Berlin, DE

⑦4 Vertreter:
Eisenführ, Speiser & Partner, 14195 Berlin

⑦2 Erfinder:
Beuthan, Jürgen, Dr., Prof., 12165 Berlin, DE;
Eberle, Hans-Georg, Dr., 13353 Berlin, DE;
Helfmann, Jürgen, Dr., 14532 Kleinmachnow, DE;
Müller, Gerhard, Dr., Prof., 14129 Berlin, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤4 Verfahren und Vorrichtung zur Analyse molekularer Reaktionsprodukte bei biologischen Zellen

⑤7 Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren, mit der unter nahfeldoptischen Bedingungen in einem Meß- und Auswertevorgang einer großen Anzahl von Zellen hinsichtlich ihres Reaktionszustands mit molekularen Reaktanten berührt werden kann.
Eine Probephase ist dadurch gekennzeichnet, daß in sie Lichtquellen unterschiedlichen Aperturdurchmessers im Nano- bzw. Mikrobereich eingebracht sind. Das 2D-Nanolichtquellen-Array wird durch eine Vielzahl von Nahfeldlichtquellen, die rasterförmig nebeneinander angeordnet sind und gemeinsam oder nacheinander angeregt werden, realisiert. Als Trägermaterial wird ein Halbleiterwerkstoff verwendet.

DE 198 58 490 A 1

Beschreibung

Aufgabenstellung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung und ein Verfahren zu schaffen, mit den unter nahfeldoptischen Bedingungen in einem Meß- und Auswertevorgang einer großen Anzahl von Zellen hinsichtlich ihres Reaktionszustands mit molekularen Reaktanten beurteilt werden. Die Aufgabe besteht insbesondere darin, die Anlagerungseffizienz der molekularen Reaktanten hinsichtlich Anlagerungsdichte in den Zell-Teilarealen, in denen sich die Zielproteine befinden und hinsichtlich Anlagerungsspezifität, die dadurch gegeben ist, daß sich die Träger- oder Wirkstoffmoleküle nur an spezielle Zielproteine binden, zu bestimmen. Weiterhin ist die Aufgabe dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung zeiteffizient an einer großen Anzahl von lebenden Zellen - also auch im Nährstoffmilieu - durchgeführt werden muß und daß sich die Bestimmung an Proben im mikro- und nanoskaligen Bereich vollzieht.

Stand der Technik

Strukturen unterhalb von $0.2\ \mu\text{m}$ können mit dem Laser-Scan-Mikroskop nicht mehr erfasst werden. Für die optische Nahfeldmikroskopie werden Lichtquellen mit Abmessungen im Nanometer-Bereich verwendet. Die Lichtquellen werden dabei durch die Aperturen von Spitzen verjüngter optischer Fasern oder Mikropipetten mit Dimensionen im Bereich von einigen zehn Nanometern begrenzt. Umgekehrt können aber auch die Aperturen eingesetzt werden, um Licht vom Objekt einzusammeln. Eine zweidimensionale Registrierung der Absorption bzw. Fluoreszenz der nanoskaligen Zellstrukturen wird durch serielles Abtasten des untersuchten Objekts durch die Nahfeldsonde erreicht. Hierzu muß die Sonde zweidimensional (x-y-Ebene) bewegt und an jeder x-y-Position (Bildpunkt) die Nahfeldbedingung (Abstand Sonde-Objekt $< 50\ \text{nm}$) realisiert werden.

Auf diese Weise ist die Untersuchung von Anlagerungsmechanismen bei Einzelzellen und Zellmembranen mit der Nahfeldmikroskopie prinzipiell möglich. Bei Wahl einer geeigneten Wellenlänge der Beleuchtungseinrichtung kann - insbesondere wenn die Absorption der Probenmoleküle bekannt ist - eine Anlagerungsverteilung auf der Oberfläche einer Zellmembran beobachtet und/oder vermessen werden. Mit modifizierter Anordnung und angepaßtem Verfahren ist auch eine fluoreszenzoptische Bestimmung möglich. In diesem Fall liegt das Schwergewicht auf der Bestimmung der Bindungsspezifität.

Die Nahfeldmikroskopie nach dem Stand der Technik ist jedoch mit zwei wesentlichen Einschränkungen behaftet. Zum einen ist die Anlagerungseffizienz nur an jeweils einer Zelle sequentiell über zeitlich langwierige Versuchsreihen zu bestimmen und zum anderen können diese Untersuchungen gar nicht oder nur in speziellen Fällen im feuchten Nährstoffmilieu durchgeführt werden. Hochauflösende (nanoskalige) optische Untersuchungen biologischer Proben sind gegenwärtig nur im fixierten bzw. trockenen Zustand mit hinreichender Genauigkeit und Zuverlässigkeit möglich. Zum einen, weil die Nadelsonde das zu untersuchende Objekt beeinflusst (Abstandskontrolle durch Lateralkraft) und bei in Nährlösung befindlichen Zellen die Annäherung zur Einhaltung der Nahfeldbedingung nicht gewährleistet ist. Zum anderen wird bei der seriellen Abtastung durch Verfahren der Sonde (Rasterzeit für den gesamten Bildbereich: 30-300 s) ein großer Teil der Reaktionskinetik an biologischen Membranen nicht erfaßt (die Anlagerungsdynamik von Antikörpern an Zellmembranproteinen umfaßt den Zeit-

bereich von ms bis zu einigen Sekunden).

Hochauflösende Mikroskopieverfahren wie die Rasterelektronenmikroskopie (REM) und die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) erlauben prinzipiell die Ausmessung nanoskaliger Strukturen. Da ihr Funktionsprinzip eine evakuierte Umgebung und spezielle Probenpräparation erfordert, sind Untersuchungen in vivo bzw. in vitro nicht möglich. Die Proben werden im allgemeinen in getrocknetem bzw. fixiertem Zustand untersucht. Die atomare Kraftmikroskopie erlaubt zwar auf Grund der Messung von Bindungskräften eine Unterscheidung der Anlagerung von Molekülen an unterschiedliche Zellbestandteile mit subzellulärer Auflösung, jedoch sind auch hier eine starke Beeinflussung der Zellen und damit unklare Ergebnisse bei Untersuchungen in Nährlösung nicht zu vermeiden.

Die wissenschaftlich und technologisch wichtige Aufklärung der subzellulären Transportmechanismen - zeitdynamisch, orts aufgelöst und unter physiologischen Bedingungen - ist mit derzeit verfügbaren Ausrüstungen nicht zu erreichen.

Erfindungsgemäße Lösung

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß eine Probenbühne realisiert wird, die dadurch gekennzeichnet ist, daß in sie Lichtquellen unterschiedlichen Aperturdurchmessers im Nano- bzw. Mikrobereich eingebracht sind. Ihre geometrische Anordnung kann erfindungsgemäß sowohl ungeordnet als auch strukturell geordnet erfolgen. Ihre Anordnung zueinander und die Verteilungsfunktionen hinsichtlich Anzahl/Aperturgrößen-Gruppen sind sodann als bekannt vorauszusetzen.

Erfindungsgemäß wird das zweidimensionale Nanolichtquellen-Array durch eine Vielzahl von Nahfeldlichtquellen, die rasterförmig nebeneinander angeordnet sind und gemeinsam oder nacheinander angeregt werden, realisiert. Als Trägermaterial wird ein Halbleiterwerkstoff vorzugsweise Silizium oder GaAs verwendet. Die einzelnen Nahfeldlichtquellen bestehen jeweils aus einem Hohlkanal, wobei die einzelnen Hohlkanäle direkt als Nanoaperturen für die anregende Strahlung genutzt werden oder aber zur Erzeugung von Sekundärstrahlung (z. B. Fluoreszenz- oder Exzitonenstrahlung mit einem fluoreszenz- oder excitonenaktiven Material gefüllt werden. Diese Nanolichtquellenanordnung ist erfindungsgemäß von einer 2-20 nm dicken Deckschicht bedeckt, so daß eine große Probenmenge von Zellen/Zellmembranen bewegungsarm auf der Nanoquellenanordnung unter Nahfeldbedingung für die Zeit der Messung gebunden werden kann. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß sich durch eine biokompatible Adhäsionsschicht biologische Objekte (z. B. Zellen) über längere Zeit stabil an der Oberfläche fixieren lassen. Diese Schicht gewährleistet zudem die konstante Einhaltung der Nahfeldbedingung. Nun ist problemlos eine Nährflüssigkeit zugebbar, die gleichzeitig den Transport der Träger- und/oder Wirkstoffmoleküle an die Membranen der Proben ermöglicht.

Bei Registrierung der Überlappung der einzelnen Nanolichtquellen mit den Zellproben durch Auszählung der hellen Punkte bzw. Messung der Lichtintensitäten zeigt sich überraschenderweise, daß eine statistische Auswertung der Intensitätsverteilung eine Beurteilung der lateralen Ausdehnung der Zellen bzw. aktiven Zellbestandteile gestattet. Dazu müssen der Durchmesser und die Verteilung der Nanolichtquellen und die Flächendichte der Proben bekannt sein. Apertur bzw. Abstand der Nanolichtquellen sind dabei passend zur Ausdehnung der zu einer Spezies gehörenden Zellen/Zellkerne zu wählen.

Die relative Anzahl der Nanoquellen, die sich mit Objek-

ten überschneiden, hängt von der bekannten Größe und Verteilungsdichte der Quellen, sowie von der Größe, Form und Verteilungsdichte der Objekte ab, wobei die Form nur sehr geringen Einfluß hat. Die Überschneidungsverteilung läßt sich durch einfache Intensitätsmessung bei serieller Quellenanregung bestimmen. Die gemessene Intensitätsverteilungsfunktion (Fluoreszenz oder transmittiertes Licht) erlaubt bei Kenntnis der Quellengröße und -verteilung die Bestimmung der Objektgröße.

Die Anlagerung der Träger- und/oder Wirkstoffmoleküle an unterschiedliche Proteine in der Zellmembran führt bei optischer Anregung der entstehenden Komplexe durch unterschiedliche Bindungsenergien zu unterschiedlichen Absorptions-, Anregungs- bzw. Sekundärspektren (Lumineszenz-, Fluoreszenz-, Raman-gestreute Strahlung usw.). Durch die wellenlängenselektive Auswertung der gemessenen Einzelintensitäten (Transmission oder Sekundärstrahlung) läßt sich somit ergänzend zur Effektivität der Anlagerung auch deren Selektivität bestimmen.

Beim Vorliegen unterschiedlicher Anregungsspektren muß das Spektrum der von den Nanolichtquellen ausgehenden Strahlung der Forderung nach Unterscheidbarkeit unterschiedlicher Anlagerungsorte durch die Möglichkeit der selektiven Anregung genügen (integrale Registrierung). Bei Ausnutzung der Absorptions- bzw. Fluoreszenzunterschiede wird die Intensität spektral aufgelöst registriert.

Die zeitlich sehr schnelle serielle Abtastung (Anregung) der einzelnen Nanolichtquellen erfolgt erfindungsgemäß wahlweise durch Laser- oder durch Elektronenstrahl. Bei Laserstrahlanregung können die Nanolichtquellen einfach als Aperturen wirken oder aber durch erfindungsgemäß in die Aperturen eingebrachte Wandlermaterialien Fluoreszenz- oder Exzitonstrahlung emittieren. Die Materialien werden so gewählt, daß ihr Emissionsspektrum zur (selektiven) Absorption oder Anregung der untersuchten subzellulären Strukturen führt bzw. eine intensive Sekundärstrahlungsemission bewirkt. Im Falle der seriellen Elektronenstrahlanregung wird wahlweise ein effizientes Kathodolumineszenz- oder ein exzitonenaftives Material in die Nanoapertur eingebracht und von der probenabgewandten Seite des Arrays her zur Lichtemission angeregt. Als exzitonenaftives Material in den einzelnen Hohlkanälen eignet sich insbesondere Anthrazen, jedoch ist auch die Verwendung von anderen exzitonenaftiven Materialien, wie beispielsweise amorphem oder porösem Silizium, möglich.

Wahlweise werden durch geeignete Materialien in den Nanolichtquellen diese zur Abstrahlung anderer Sekundärstrahlung z. B. Lumineszenz- oder Ramanstrahlung angeregt.

Die Detektion erfolgt räumlich integral im Fernfeld, synchronisiert mit der im Rastermodus erfolgenden seriellen Anregung der einzelnen Nanolichtquellen. Die Strahlung kann zusätzlich – je nach Bedarf – wellenlängenselektiv und/oder zeitaufgelöst registriert werden. Zur Bestimmung des Überschneidungsgrades: Zellensemble – Nanoaperturmatrix wird im einfachsten Fall eine auf den jeweiligen Anregungsort bezogene Intensitätsmessung ausreichen. Die Größe der Zellen bzw. Zellbausteine kann durch bekannte Verfahren der statistischen Mikroskopie aus den gemessenen Einzelintensitäten ermittelt werden. Sind die Abmessungen der interessierenden Zellen bzw. Zellbausteine bekannt, lassen sich zellspezifische Verteilungsfunktionen bestimmen. Zur Beurteilung der Anlagerungseffektivität und -spezifität ist eine frequenzselektive Anregung und/oder Detektion vorgesehen.

Erfindungsgemäß zeigt ein bevorzugtes Ausführungsbeispiel in Fig. 1, daß die Bestimmung der Anlagerungseffizienz in einem 2-Phasen-System von Antikörpergruppen 1

und 2 an speziell verteilte Zielproteingruppen 3 und 4 der Zellenart möglich ist. In Fig. 1 werden Antikörper der Gruppen 1 und 2 in die Nährlösung 6 gegeben. Die Zellmembranen liegen auf einer Adhäsionsschicht 7, die sich selbst wiederum auf dem zweidimensionalen Nanoquellenarray 8 befindet. Die Nanoquellen können unterschiedliche Aperturen 9 und 10 aufweisen. Der Bedeckungsgrad der einzelnen Nanoaperturen wird durch Messung der bei serieller Anregung registrierten Absorptions- oder Fluoreszenzintensität bestimmt und erlaubt bei wellenlängenselektiver Registrierung eine Unterscheidung zwischen den unterschiedlichen Anlagerungsmöglichkeiten (1 oder 2) an (3 oder 4).

Als ein konkretes Beispiel kann die Zwischenanlagerung von Östrogenen vom Typ: beta-Estradiol an Mammarkarzinomzellen vor dem Transport durch die Zellmembran betrachtet werden. Die Zellen haben Rezeptoren für Östrogene. Die Anlagerung an diese Rezeptoren führt zu einer Verschiebung der für ungebundene Östrogene geltenden Fluoreszenzwellenlänge von 569 nm (50 mmolar in Ethanol, Anregung bei 488 nm). Befindet sich eine bekannte Anzahl von Mammarkarzinomzellen in der Nährlösung so wird bei Zugabe von Östrogenen bekannter Konzentration eine Zwischenanlagerung auf der Zellmembran stattfinden. Durch Vergleich der bei der verschobenen Wellenlänge registrierten Intensitäten zur Gesamtintensität kann die Anlagerungsspezifität an den betrachteten Rezeptor bestimmt werden.

Fig. 2 zeigt die komplette Meßanordnung mit dem anregenden Elektronen- oder Laserstrahl 11, der im Rastermodus über die Nanoquellenmatrix 8 geführt wird. Dabei erfolgt die Anregung durch die Einhaltung der Nahfeldbedingung derart, daß die Auflösung besser als 200 nm ist. Die durch die Probe transmittierte Strahlung oder die von ihr ausgehende Fluoreszenzstrahlung werden mit einem großflächigen Detektor 13 im Fernfeld registriert. Je nach Aufgabenstellung wird erfindungsgemäß die Strahlung wahlweise durch einen Monochromator 12 spektral zerlegt und somit ein wellenlängenselektiver Nachweis realisiert.

Fig. 3 stellt die möglichen Überlappungsgrade einer Anordnung 1 von Nanoaperturen (Nanolichtquellen) 2 durch Zellen bzw. Zellbausteine 3 dar. Je nach Bedeckungsgrad der Nanolichtquellen ergibt sich eine unterschiedliche transmittierte bzw.

Fluoreszenzintensität bei serieller Anregung der einzelnen Nanolichtquellen.

Um mit Verfahren der statistischen Mikroskopie die Größe von Molekülen oder Zellbausteinen bestimmen zu können, müssen die Verteilung und die Durchmesser der Aperturen der Nanolichtquellenmatrix sowie die laterale Konzentration der untersuchten Objekte bekannt sein. Für die Untersuchung von Nanoobjekten deutlich unterschiedlicher Größe sind Arrays mit unterschiedlichem Aperturdurchmesser und -abstand einzusetzen. Durch wellenlängenselektive Anregung und/oder wellenlängenselektiven Nachweis ist es möglich, zwischen zwei (oder mehreren) Molekülarten bzw. durch Anlagerung von Molekülen (z. B. Wirkstoffmolekülen oder Antikörpern) entstehenden Molekülkomplexen zu unterscheiden. Dazu müssen die Intensität der bei zeitlich sequentieller Anregung der einzelnen Nanolichtquellen emittierten Strahlung, die durch die zu untersuchenden Objekte beeinflusst wird oder die dabei erzeugte Fluoreszenzstrahlung wellenlängenselektiv registriert werden.

Patentansprüche

1. Verfahren und Vorrichtung zur Analyse biologischer Objekte mit nahfeldoptischen Methoden, da-

durch gekennzeichnet, daß ein 2D-Nanolichtquellen-Array, bestehend aus einer großen Anzahl von Einzellichtquellen, die seriell durch Laserstrahlung im Wellenlängenbereich zwischen $0,150\ \mu\text{m}$ und $11,0\ \mu\text{m}$ angeregt werden, zur Analyse genutzt wird.

2. Verfahren und Vorrichtung zur Analyse biologischer Objekte mit nahfeldoptischen Methoden, dadurch gekennzeichnet, daß ein 2D-Nanolichtquellen-Array, bestehend aus einer großen Anzahl von Einzellichtquellen, die in Variation des Anspruchs 1 durch einen Elektronenstrahl mit einer Energie im Bereich zwischen $0,01\ \text{eV}$ und $10\ \text{keV}$ angeregt werden, zur Analyse genutzt wird.

3. Verfahren und Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Anregung der Nanolichtquellen von der probenabgewandten Seite des Arrays erfolgt und die Vakuumkammer, in der der Elektronenstrahl erzeugt und abgelenkt wird, durch ein Elektronenfenster von den sich in Normalatmosphäre befindenden Proben abgetrennt ist.

4. Verfahren und Vorrichtung nach Anspruch 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Elektronenfenster aus Beryllium oder Kapton besteht.

5. Verfahren und Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Strahlungsnachweis räumlich integral jedoch wellenlängenselektiv erfolgt.

6. Verfahren und Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die einzelnen Nanolichtquellen durch einen Laserstrahl abgerastert werden, der ein in die Hohlkanäle eingebrachtes fluoreszenz- bzw. exzitonenaktives Material zur Emission von Sekundärstrahlung anregt.

7. Verfahren und Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Anregung der einzelnen Nanolichtquellen durch einen Elektronenstrahl erfolgt, der ein in die Hohlkanäle eingebrachtes kathodolumineszendes Material zur Lichtemission anregt.

8. Verfahren und Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Anregung der einzelnen Nanolichtquellen durch einen Elektronenstrahl erfolgt, der ein in die Hohlkanäle eingebrachtes exzitonenaktives Material zur Lichtemission anregt.

9. Verfahren und Vorrichtung nach Anspruch 1-6 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß das exzitonenaktive Material amorphes oder poröses Silizium oder Anthrazen ist.

10. Verfahren und Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine Deckschicht, die auf das Nanolichtquellen-Array aufgebracht wird, dieses gegen mögliche Einwirkungen durch die zu untersuchenden Zellproben schützt.

11. Verfahren und Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 2 und Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß auf die Deckschicht eine Trägerschicht (Adhäsionsschicht) aufgebracht wird, die das biologische Meßobjekt in Nährlösung hält und die Stoffwechsel- und Transportmechanismen der biologischen Nanopräparate nicht beeinflußt.

12. Verfahren und Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 2 und Anspruch 7 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß Deck- und Adhäsionsschicht gemeinsam die Nahfeldbedingung für die zu untersuchenden Proben gewährleisten.

13. Verfahren und Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 2 und Anspruch 7 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Adhäsionsschicht aus Lipiden besteht.

14. Verfahren und Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 2 und Anspruch 7 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Adhäsionsschicht aus Zellulose-Derivaten besteht.

15. Verfahren und Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Bestimmung der statistischen Verteilungsfunktionen mehrerer unterschiedlicher Zellarten oder Zellbausteine durch spektral selektive Registrierung.

16. Verfahren und Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Bestimmung der Effektivität der Anlagerung von Wirkstoff- und/oder Trägermolekülen an Zellbausteine bekannter statistischer Verteilung.

17. Verfahren und Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 14 zur Bestimmung der Selektivität der Anlagerung von Wirkstoff- und/oder Trägermolekülen an vorgegebene Zielmolekülgruppen bekannter statistischer Verteilung.

18. Verfahren und Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 unter Nutzung der selektiven Anregung des Zielkomplexes (Zielmolekül mit daran angelagertem Wirkstoff- und/oder Trägermolekül) durch Wahl einer Anregungswellenlänge, die nur bei diesem Komplex zu einer intensiven Sekundärstrahlung führt.

19. Verfahren und Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 mit einer wellenlängenselektiven Detektion der von den angeregten Zellkomplexen emittierten Sekundärstrahlung.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Fig. 1

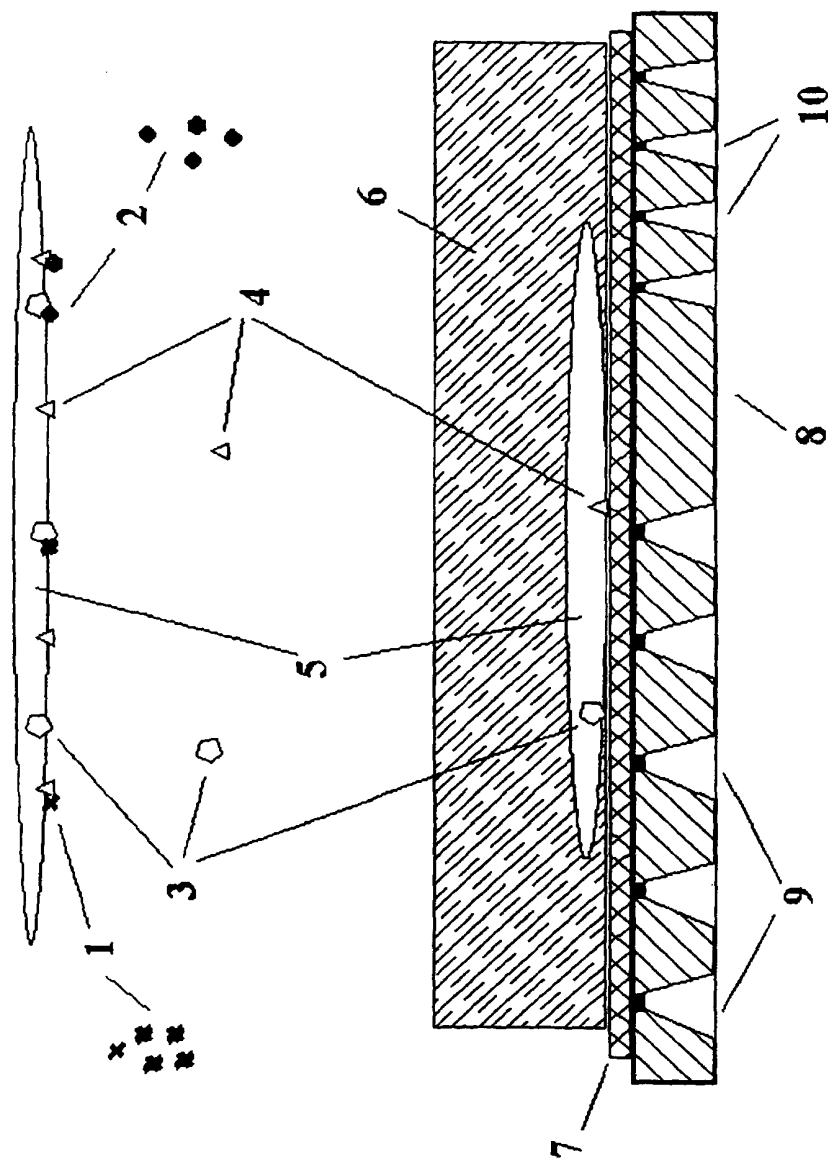
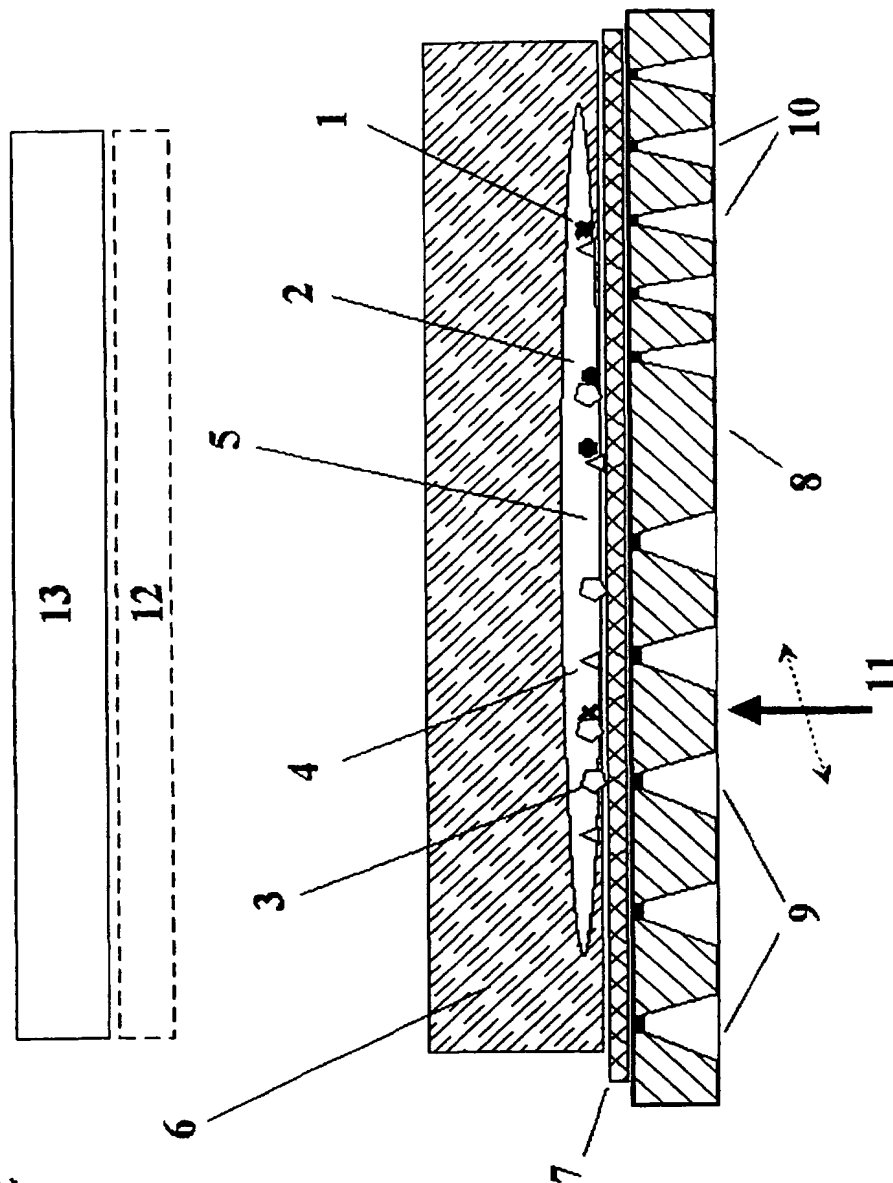


Fig. 2



Nummer:

7:

Legungstag:

DE 198 58 490 A1

G 01 N 21/00

21. Juni 2000

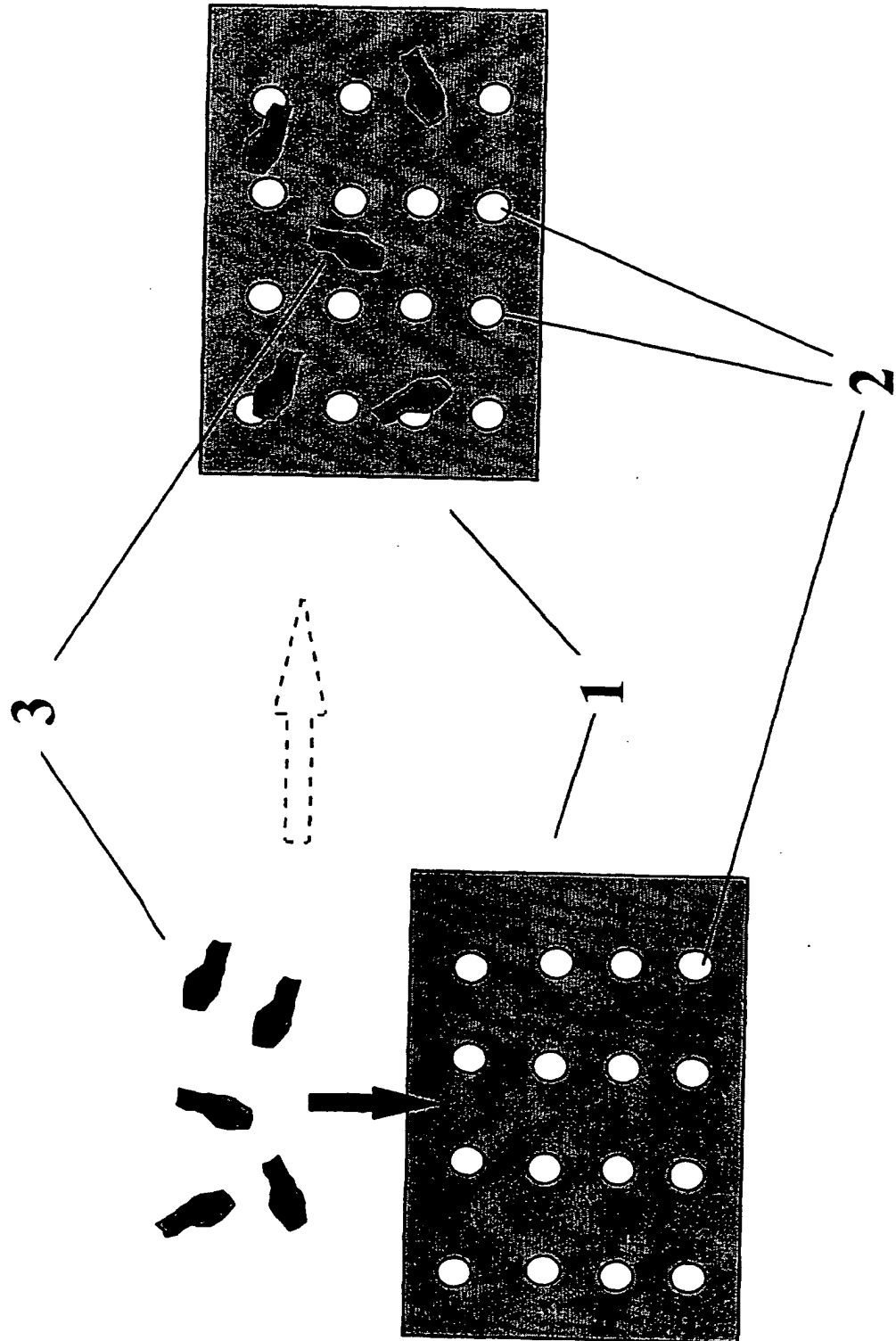


Fig. 3